

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-267834

(43) 公開日 平成10年(1998)10月9日

(51) Int.Cl.⁹

識別記号

F I

G 0 1 N 21/27

G 0 1 N 21/27

C

27/327

33/543

5 9 5

33/543

5 9 5

27/30

3 5 7

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願平9-73645

(71) 出願人 000002897

大日本印刷株式会社

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

(22) 出願日

平成9年(1997)3月26日

(72) 発明者 永田 良平

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

大日本印刷株式会社内

(72) 発明者 中村 洋之

東京都新宿区市谷加賀町一丁目1番1号

大日本印刷株式会社内

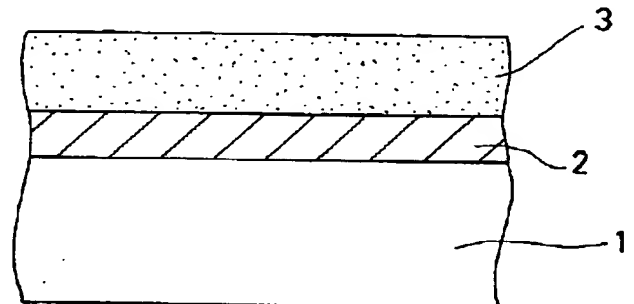
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ及びその製造方法

(57) 【要約】

【解決手段】 透明基板、該透明基板上に配置される金属膜、及び該金属膜上に配置される有機ケイ素膜を備えていることを特徴とする表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ及びその製造方法。

【効果】 製造が容易であり、また、固定化する生理活性物質が少量であっても、良好な感度で測定対象物質を測定することのできる表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 透明基板、該透明基板上に配置される金属膜、及び該金属膜上に配置される有機ケイ素膜を備えていることを特徴とする表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項2】 前記有機ケイ素膜がシランカップリング剤により形成された膜であることを特徴とする、請求項1記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項3】 前記シランカップリング剤が3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシラン、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン及びジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシランからなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする、請求項2記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ。

【請求項4】 透明基板上に金属膜を配置した後、該金属膜の上に有機ケイ素膜を配置することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップの製造方法。

【請求項5】 前記有機ケイ素膜をシランカップリング剤を用いて形成させることを特徴とする、請求項4記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップの製造方法。

【請求項6】 シランカップリング剤が、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシラン、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン及びジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシランからなる群から選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする、請求項5記載の表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、臨床検査等で免疫反応を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、リガンドの変化を高感度で検出することのできる表面プラズモン共鳴(SPR)を利用した免疫センサーが使用されている。

【0003】このような表面プラズモン共鳴を利用した

測定装置(表面プラズモン共鳴バイオセンサー)で一般的に使用される測定チップは、図2に示すような構造を有する。即ち、ガラス基板1'上に成膜された金属膜2'の上に、多孔性材料5が形成されており、この多孔性材料5の表面及び内部に酵素、抗体等の生理活性物質が担持又は固定されている。この多孔性材料5としては、例えば合成繊維、天然繊維、無機繊維等からなる織物、編物、不織布や、多孔性の無機又は有機材料などが使用される(特開平3-164195号公報参照)。また、市販品(BI Acore 2000用、ファルマシアバイオセンサー社製)では、この多孔性材料5としてカルボキシメチルデキストランが用いられている。

【0004】しかしながら、測定対象物と実質的にかつ効率的に相互作用する生理活性物質は、多孔性材料5の表面に存在するものだけであるため、多孔性材料5の内部に担持又は固定されている生理活性物質は有効に機能せず、その分感度が低下することとなる。

【0005】また、生理活性物質を金属膜2'に固定する方法として、LB(Langmuir-Blodgett)法が用いられる場合もあるが(特開平5-288672号公報参照)、LB膜と金属膜との結合が弱く、LB膜が生理活性物質と共に脱落するという問題がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、固定化する生理活性物質が少量であっても、良好な感度が得られ、かつ製造が容易な表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定チップを提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題に鑑み鋭意研究の結果、本発明者は、金属膜上に有機ケイ素膜を形成し、該有機ケイ素膜に生理活性物質を固定化すれば、使用する生理活性物質が少量であっても良好な感度が得られることを見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は、透明基板、該透明基板上に配置される金属膜、及び該金属膜上に配置される有機ケイ素膜を備えていることを特徴とする表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップである。

【0008】また、本発明は、透明基板上に金属膜を配置した後、該金属膜の上に有機ケイ素膜を配置することを特徴とする、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップの製造方法である。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明における表面プラズモン共鳴バイオセンサー用測定チップ(以下、単に「測定チップ」という)とは、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに使用されるチップであって、該センサーより照射された光を透過及び反射する部分、並びに生理活性物質を固定する部分とを含む部材をいい、該センサーの本体に固着されるものであってもよく、また脱着可能なものであってもよい。

【0010】本発明の測定チップは、透明基板、該透明基板上に配置される金属膜、及び該金属膜上に配置される有機ケイ素膜を備えている。ここで、「透明基板上に配置される金属膜」とは、金属膜が直接接して透明基板上に配置されている場合のほか、金属膜が透明基板に直接接することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む意である。「金属膜上に配置される有機ケイ素膜」も上記と同様の意味である。

【0011】本発明の一例による測定チップの断面概略図を図1に示す。本実施例による測定チップは、透明基板1と、透明基板1上に形成された金属膜2と、金属膜2の上に形成された有機ケイ素膜3とを有する。透明基板1としては、通常表面プラズモン共鳴バイオセンサー用の測定チップに使用されるものであればどのようなものでもよく、一般的にはガラス、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用でき、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましく、その厚さは0.1～20mm程度である。

【0012】金属膜2としては、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。この金属膜2に使用することのできる金属の種類としては、金、銀、銅、アルミニウム、白金等が挙げられ、それらを単独で又は組み合わせて使用することができる。また、上記透明基板1への付着性を考慮して、透明基板1と金、銀等からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。

【0013】金属膜2の膜厚は、100～2000Åであるのが好ましく、特に200～600Åであるのが好ましい。3000Åを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、5～50Åであるのが好ましい。

【0014】金属膜2の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。これらの方法の中でもスパッタ法を用いるのが好ましい。

【0015】有機ケイ素膜3とは、Si-O及びSi-C結合を分子内に含む高分子からなる膜をいう。該有機ケイ素膜3は、例えば、シランカップリング剤を用いて形成させることができる。シランカップリング剤とは、その分子中にビニル基、エポキシ基、アミノ基、メルカプト基のような有機材料と親和性のある有機官能基と、メトキシ基、エトキシ基のような無機材料と親和性のある加水分解基を有する有機ケイ素化合物のことをいう。シランカップリング剤中の加水分解基は、金属膜2中の金属原子と結合し、有機官能基は生理活性物質と結合する。これにより金属膜2、有機ケイ素膜3及び生理活性物質の三者は強固に固定される。本発明に使用できるシ

ランカップリング剤は、上記定義に該当するものであればいかなるものでもよく、3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルトリメトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン、3-(2-アミノエチルアミノプロピル)ジメトキシメチルシラン、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン、ジメトキシ-3-メルカプトプロピルメチルシランなどを単独又は組み合わせて使用することができる。

10 【0016】有機ケイ素膜3は、ケイ素原子が上下方向に重ならない単分子層膜であることが好ましい。単分子層膜にすることにより、生理活性物質と相互作用する測定対象物と、入射した光が反射する面との距離を短くすることができ、良好な感度を得られるとともに、使用するシランカップリング剤の量を必要最小限に抑え、コストの低減化を図ることができる。

【0017】また、有機ケイ素膜3は、細密充填構造をとるのが好ましい。細密充填構造とは、有機ケイ素膜3

20 を構成するSi及びOの網目構造中に他の分子が貫入する余地のないほど、網目構造が緻密であることをいう。細密充填構造をとることにより、生理活性物質を高い密度で均等に固定化することができ、測定感度を向上させることができる。有機ケイ素膜3が細密充填構造をとるかどうかは、以下の方法により確認することができる。

30 【0018】プロピルエトキシシラン（シランカップリング剤である3-アミノプロピルトリエトキシシランのアミノ基を水素原子で置換した化合物）を用いて金属膜2上に有機ケイ素膜3を形成させる。プロピルエトキシシランは、強い疎水性を有する化合物なので、有機ケイ素膜2の表面の濡れ程度により、プロピルエトキシシランの密度（即ち、有機ケイ素膜3の細密充填の程度）を知ることができる。即ち、シリンジにより蒸留水を滴下した際に表面が一様に水滴を弾くのであれば有機ケイ素膜3は細密充填構造をとっており、表面が部分的にしか水を弾かないのであれば、細密充填構造をとっておらず、Si及びOの網目構造に空隙が存在することが推測される。

40 【0019】有機ケイ素膜3は、例えば、シランカップリング剤を用いることにより形成させることができる。具体的には、シランカップリング剤の飽和蒸気中に金属膜2を一定時間暴露する方法（飽和蒸気法）、シランカップリング剤を含む溶液中に金属膜2を一定時間浸漬する方法（浸漬法）、スピンコータを用いる方法（スピンコーティング法）、グラビア印刷機を用いる方法（グラビア法）などにより成膜することができる。本発明においては、これらのいずれの方法を用いてもよいが、細密充填構造をとる単分子層膜を形成させるためには、飽和蒸気法を用いるのが好ましい。

50 【0020】飽和蒸気法においては、暴露時の温度、湿度なども単分子層構造及び細密充填構造の形成に影響を

与えるが、暴露時間が最も重要な要素である。暴露時間が長すぎると単分子層構造が得られず、また、暴露時間が短すぎると細密充填構造が得られない。暴露時間は、通常、1～600分とするのが好ましく、15～90分とするのが更に好ましい。

【0021】本発明における有機ケイ素膜3は、以下の様な利点を有する。

生理活性物質を金属膜2に極めて近い位置に固定することができるので、従来の測定チップを使用する場合よりも大幅に測定感度を向上させることができる。

成膜が容易であり、また、一度に大量の成膜処理ができる。

シランカップリング剤の種類を変えることにより、膜厚だけでなく、表面改質、官能基導入などの化学修飾が可能となる。

本発明の測定チップは、有機ケイ素膜3に、直接又は水溶性二価性試薬を介して、生理活性物質を固定して使用する。

【0022】生理活性物質としては、測定対象物と相互作用するものであれば特に限定されず、例えば免疫蛋白質、酵素、微生物、核酸等が挙げられる。免疫蛋白質としては、測定対象物を抗原とする抗体やハプテンなどを例示することができる。抗体としては、種々の免疫グロブリン、即ちIgG、IgM、IgA、IgE、IgDを使用することができる。具体的には、測定対象物がヒト血清アルブミンであれば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体、あるいは病原性大腸菌の中でO抗原26、86、55、111、157などに対する抗体等を使用することができる。

【0023】酵素としては、測定対象物又は測定対象物から代謝される物質に対して活性を示すものであれば、特に限定されることなく、種々の酵素、例えば酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、測定対象物がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、測定対象物がコレステロールであれば、コレステロールオキシダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を測定対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。

【0024】微生物としては、特に限定されることなく、大腸菌をはじめとする種々の微生物を使用すること

ができる。核酸としては、測定の対象とする核酸と相補的にハイブリダイズするものを使用することができる。核酸は、DNA、RNAのいずれも使用できる。

【0025】生理活性物質として抗体4を用いた場合、通常は抗体4のFcフラグメントが有機ケイ素膜3の表面のみに固定化され、抗体4は単分子層状態に形成される。但し、抗体4のFabフラグメントが有機ケイ素膜3から離れる程、感度や反応速度が低下するため、図3に示すようにFabフラグメント(図3(a))又はF(a b')₂フラグメント(図3(b))を直接有機ケイ素膜3に固定化して、感度や反応速度を向上させてもよい。

【0026】生理活性物質の厚さは、使用する生理活性物質自体の大きさにもよるが、100～3000Åであるのが好ましく、特に100～1000Åであるのが好ましい。生理活性物質の固定化方法は常法によって行えばよく、例えば、所定量の生理活性物質を有機ケイ素膜3に所定時間接触させることにより固定化することができる。また、フローセル型の表面プラズモン共鳴バイオセンサーに測定チップを設置して一定流量の生理活性物質を所定時間(所定量)流すことによっても固定化できる。

【0027】生理活性物質として抗体4を用いた場合であって、抗体4のFabフラグメントを直接有機ケイ素膜3に固定化する場合には、パパインを用いて抗体4を部分分解した後、同様の処理を行えばよい。一方、抗体4のF(a b')₂フラグメントを直接有機ケイ素膜3に固定化する場合には、ペプシンを用いて抗体4を部分分解した後、同様の処理を行えばよい。

【0028】水溶性二価性試薬は、生理活性物質を共有結合的に強固に固定化できるものであれば、特に限定されない。そのような水溶性二価性試薬としては、例えばグルタルアルデヒド、過ヨウ素酸、N、N'-o-フェニレンジマレイミド、N-スクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート、N-スクシニミジルマレイミド酢酸、N-スクシニミジル-4-マレイミド酪酸、N-スクシニミジル-6-マレイミドヘキサ酸、N-スルホスクシニミジル-4-マレイミドメチルシクロヘキサ-1-カルボン酸、N-スルホスクシニミジル-3-マレイミド安息香酸、N-(4-マレイミドブチロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(6-マレイミドカプロイロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(8-マレイミドカプリロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N-(11-マレイミドウンデカノイロキシ)スルホスクシンイミド・ナトリウム塩、N[2-(1-ピペラジニル)エチル]マレイミド・二塩酸等が挙げられ、それぞれ単独で又は組み合わせて使用することができる。これらの中でも、汎用性が高く、取扱いの容易なグルタルアルデヒドが好ましい。

【0029】このように水溶性二価試薬を介して生理活

性物質を強固に固定化することにより、当該測定チップを洗浄しても生理活性物質の固定化を維持できるため、繰り返し測定に使用することができるという利点が得られる。水溶性二価試薬は、有機ケイ素膜3に接触させることにより固定化できる。この水溶性二価試薬に生理活性物質を固定化する方法は、有機ケイ素膜3に生理活性物質を固定化する場合と同様にして行うことができる。

【0030】本発明の測定チップは、例えば、図4に示されるような表面プラズモン共鳴バイオセンサーに使用することができる。この表面プラズモン共鳴バイオセンサーは、カートリッジブロック7と、光源8と、検出器9とを有し、カートリッジブロック7の上に本発明の測定チップ6を設置して使用する。測定チップ6は、透明基板が上になるように設置する。カートリッジブロック7の上面には凹部が設けられており、この凹部と上記測定チップ6とで測定セル71が構成される。測定セル71は、流路72、73によりカートリッジブロック7の外部に連通しており、試料は流路72を通じて測定セル71中に流れ込み、測定に供された後流路73を通じて外部に排出される。

【0031】光源8からは、測定チップ6の透明基板に向かって単色光が照射され（入射光80）、測定チップ6の裏面に設けられた金属膜で反射したその反射光90が、検出器9に入光する。検出器9では、反射光90の強度を検出することができる。

【0032】上記のような構造によって、ある入射角 θ に対して谷を形成する反射光強度曲線が得られる（図9参照）。反射光強度曲線における谷は、表面プラズモン共鳴によるものである。即ち、光が測定チップ6の透明基板と外との界面で全反射するとき、その界面にエバネッセント波といわれる表面波が生じ、一方、金属膜にも表面プラズモンといわれる表面波が生じる。この2つの表面波の波数が一致すると共鳴が起こり、光のエネルギーの一部が表面プラズモンを励起するために使用され、反射光の強度が低下する。ここで、表面プラズモンの波数は、金属膜表面のごく近くにある媒質の屈折率の影響を受けるため、測定対象物質と生理活性物質との相互作用により媒質の屈折率が変化すると、表面プラズモン共鳴が生じる入射角 θ が変化する。従って、反射光強度曲線の谷のずれによって、測定対象物質の濃度の変化を検知することができる。入射角 θ の変化量は共鳴シグナルといわれ、 10^{-4} の変化を1RUとして表す。

【0033】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】本実施例では、図1に示されるような構成を有する測定チップを作製した。

【0034】透明基板としては、18mm×18mm、厚さ0.17

mmのカバーガラス（松浪硝子工業社製）を使用した。この透明基板上に、スパッタリングによりクロムからなる層、次いで金からなる層を形成した。スパッタリングは、クロムについては100 W、30秒間、金については100 W、150 秒間で行った。得られたクロム層の厚さは32.2Åであり、金層の厚さは474 Åであった。

【0035】上記の金属膜を有する透明基板を、シランカップリング剤の飽和蒸気中に暴露し、金属膜上に有機ケイ素膜を形成させた。まず、10mlサンプルびんに原液ののままのγ-アミノプロピルエトキシシラン（ $\text{H}_2\text{N}-(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{Si}(\text{OEt})_2$ 、東芝シリコン（株）TSL 8331）を500 μl 入れ、室温で24時間放置し、びん内部をγ-アミノプロピルエトキシシランの飽和蒸気で満たした。次に、上記で作成した透明基板を、金属膜部分が露出するようにPET製のマスク（支持具）の中央部に固定し、このマスクをサンプルびんの開口部に載せ、15分又は90分間放置し、カバーガラスの金属膜上に有機ケイ素膜を形成させ、測定チップを作製した。

【0036】この測定チップを、市販の表面プラズモン共鳴バイオセンサー（ファルマシアバイオセンサー社製、BIAcore2000）のカートリッジブロック上に設置した。このセンサーは図4に示すような構造を有する。このセンサーの測定セルに5%グルタルアルデヒドを流速1 μl/分で20分間流し込み、次いで、1mg/mlの抗ヒト血清アルブミン抗体を流速1 μl/分で10時間流し込み、有機ケイ素膜の表面に抗ヒト血清アルブミン抗体を固定化した。ここで、固定されていない余分な抗体を洗い流すために、0.1 Nの塩酸5 μl を流速5 μl/min で測定セルに流し込んだ。

【0037】抗体を固定化した測定チップを設置した測定セルに、0.01、10、又は100 μg/mlに希釈したヒト血清アルブミン（HSA）を流速5 μl/分で10分間流しながら光強度を測定し、共鳴シグナル（RU）を求めた。また、対照としてウシ血清アルブミン（BSA）を流した場合の共鳴シグナルも求めた。この結果を図5に示す。図中、●はシランカップリング剤に90分暴露して作製したチップでHSAを測定した場合であり、○はシランカップリング剤に15分暴露して作製したチップでHSAを測定した場合であり、■はシランカップリング剤に90分暴露して作製したチップでBSAを測定した場合であり、□はシランカップリング剤に15分暴露して作製したチップでBSAを測定した場合である。

【0038】図5に示すように、BSAを流した場合には、共鳴シグナルに変化はみられなかったが、HSAを流した場合には、試料濃度と共鳴シグナルに正比例に類似した関係がみられた。これは、抗体の特異的反応に起因するものであるものと推測される。これより、本実施例による測定チップを用いれば、共鳴シグナルの値を測定することにより抗原を定量することができる。

【0039】また、シランカップリング剤に長時間暴露

して作製したチップを使用した場合の方が共鳴シグナルが高かった。これは、長時間暴露することにより、それだけ多くのアミノ基が金属膜上に導入され、その結果固定化される抗体の数も増加したためと推測される。

【0040】（実施例2）実施例1と同様にして作成した測定チップを、実施例1で使用したバイオセンサーのカートリッジブロック上に設置し、測定セルに5%グルタルアルデヒドを流速1 μ l/分で20分間流し込み、次いで、0.5 mg/mlの抗アトラジン抗体を流速1 μ l/分で60分間流し込み、有機ケイ素膜に抗アトラジン抗体を固定した。固定されていない余分な抗体は、実施例1と同様にして除去した。

【0041】抗体を固定した測定チップを設置した測定セルに、0.01、0.1、1、10、又は100 ppmに希釈したアトラジンを流速5 μ l/分で10分間流しながら光強度を測定し、共鳴シグナル（RU）を求めた。アトラジンは分子量が小さいため（MW:215.5）、単独で流すと共鳴シグナルが通常の抗原を用いた場合の1/5程度しか観測できない。そこで、アトラジンを西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼで標識して流した。また、対照としてBSAを流した場合の共鳴シグナルも求めた。この結果を図6に示す。図中、▲はシランカップリング剤に90分暴露して作製したチップでアトラジンを測定した場合であり、△はシランカップリング剤に15分暴露して作製したチップでアトラジンを測定した場合であり、■はシランカップリング剤に90分暴露して作製したチップでBSAを測定した場合であり、□はシランカップリング剤に15分暴露して作製したチップでBSAを測定した場合である。

【0042】図6に示すように、BSAを流した場合には、共鳴シグナルに変化はみられなかったが、アトラジンを流した場合（90分暴露チップ）には、試料濃度と共鳴シグナルの間にほぼ正比例の関係がみられた。これは、抗体の特異的反応に起因するものであるものと推測される。これより、本実施例による測定チップを用いれば、共鳴シグナルの値を測定することにより抗原を定量することができる。なお、15分暴露チップでは、試料濃度と共鳴シグナルの間に正比例関係がみられなかったが、これは試料濃度1 ppm程度で抗アトラジンが飽和してしまったためと推測される。

【0043】（比較例1）実施例1で使用したバイオセンサーに、該センサー用の市販の測定チップをカートリッジブロックに設置した。この測定チップは、図7に示されるような構造を有する。

【0044】この測定チップが有する多孔性材料（カルボキシメチルデキストラン）を活性化するために、1-エチル-2, 3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド（400 mM/H₂O）とN-ヒドロキシスクシンイミド（100 mM/H₂O）との混合物35 μ lを流速5 μ l/minで測定セルに流し込んだ。次いで、50 μ g/mlの抗ヒト血清アルブミン抗体35 μ lを流速5 μ l/minで測定セルに流

し込み、カルボキシメチルデキストランに抗ヒト血清アルブミン抗体を固定化した。その後、固定化した抗体をブロッキングするためにエタノールアミン35 μ lを流速5 μ l/minで測定セルに流し込み、次いで固定されていない余分な抗体を洗い流すために、0.1 Nの塩酸5 μ lを流速5 μ l/minで測定セルに流し込んだ。

【0045】抗体を固定化した測定チップを設置した測定セルに、実施例1と同様にしてHSAを流しながら光強度を測定し、共鳴シグナル（RU）を求めた。また、対照としてBSAを流した場合の共鳴シグナルも求めた。この結果を図8に示す。図中、×がHSAを流した場合であり、+がBSAを流した場合である。

【0046】図8に示すように、BSAを流した場合には、共鳴シグナルに変化はみられなかったが、HSAを流した場合には、試料濃度と共鳴シグナルの間にほぼ正比例の関係がみられた。これは、抗体の特異的反応に起因するものであるものと推測される。

【0047】〔実施例3〕実施例1と同様にして測定チップを作製し、抗ヒト血清アルブミン抗体を固定した後、1、10、又は100 μ g/mlに希釈したHSAを流速5 μ l/分で10分間流しながら光強度を測定し、共鳴シグナル（RU）を求めた。また、対照としてBSAを流した場合の共鳴シグナルも求めた。この結果を図8に示す。図中、●はシランカップリング剤に90分暴露して作製したチップでHSAを測定した場合であり、○はシランカップリング剤に15分暴露して作製したチップでHSAを測定した場合であり、■はシランカップリング剤に90分暴露して作製したチップでBSAを測定した場合であり、□はシランカップリング剤に15分暴露して作製したチップでBSAを測定した場合である。

【0048】図8において、比較例1の測定チップを使用した場合と実施例3の測定チップを使用した場合の共鳴シグナルを比較すると、実施例3の測定チップを使用した場合には、比較例1の測定チップを使用した場合のほぼ2倍の共鳴シグナル（RU）が計測された。従って、実施例3の測定チップを使用することにより、約2倍の感度で抗原等の定量が可能である。

【0049】〔試験例1〕実施例1で作成した金属膜を有する透明基板を、実施例1で使用したバイオセンサーのカートリッジ上に設置し、入射角 θ に対応する反射光の強度を測定した。この結果を図9に示す。また、対照として、金属のみを有し、クロム層を有しない基板についても反射光強度を測定した。図中の—□—が金属及びクロム層を有する透明基板の反射光強度曲線であり、—が金属のみを有する透明基板の反射光強度曲線である。図9に示すように、金属とクロム層を設けた場合でも、金属のみを設けた場合でも、表面プラズモン共鳴が生じることがわかる。

【0050】

【発明の効果】本発明の測定チップは、製造が容易であ

り、また、固定化する生理活性物質が少量であっても、良好な感度で測定対象物質を測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一例による測定チップの概略断面図である。

【図2】従来の測定チップの概略断面図である。

【図3】抗体を固定した測定チップの概略断面図である。(a)は抗体のFabフラグメントを固定化した例、(b)は抗体のF(ab')₂フラグメントを固定化した例を示す図である。

【図4】本発明の測定チップに使用する表面プラズモン共鳴バイオセンサーの概念図である。

【図5】実施例1で得られた、HSA濃度と共鳴シグナルとの関係を示すグラフである。

【図6】実施例2で得られた、アトラジン濃度と共鳴シグナルとの関係を示すグラフである。

【図7】比較例1で使用した測定チップの概略断面図である。

【図8】実施例3及び比較例1で得られた、HSA濃度 *

*と共鳴シグナルとの関係を示すグラフである。

【図9】金属膜を形成した基板の反射光強度曲線を示すグラフである。

【符号の説明】

1, 1'…透明基板

2…金属膜

2'…金属膜

3…有機ケイ素膜

4…抗体

10 5…多孔性材料

6…測定チップ

7…カートリッジブロック

71…測定セル

72, 73…流路

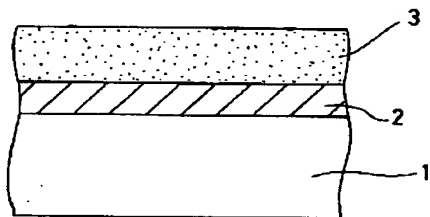
8…光源

80…入射光

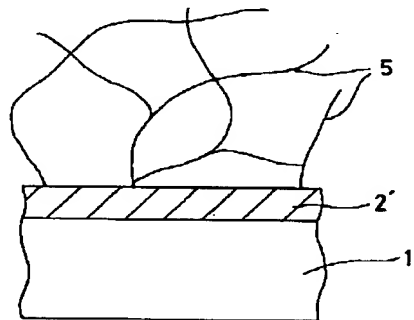
9…検出器

90…反射光

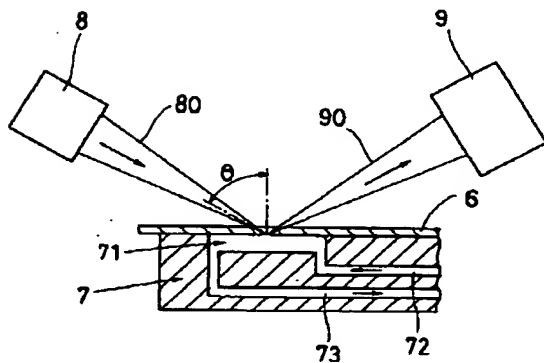
【図1】



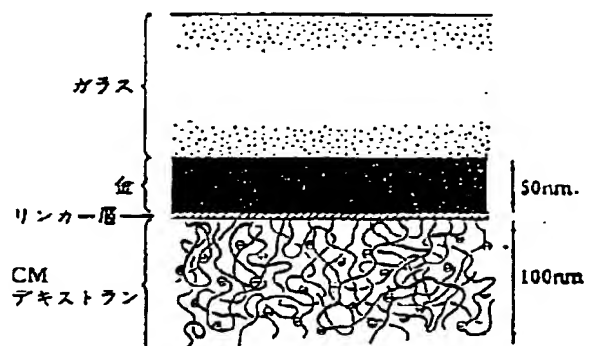
【図2】



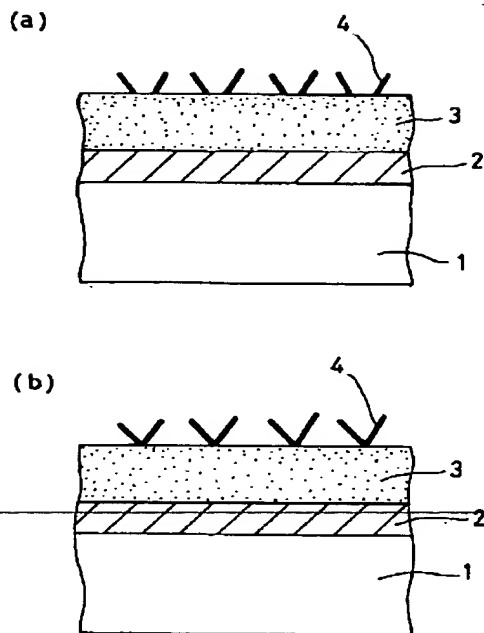
【図4】



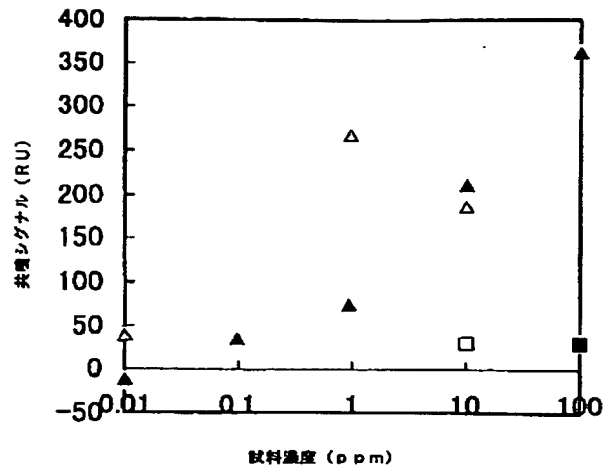
【図7】



【図3】

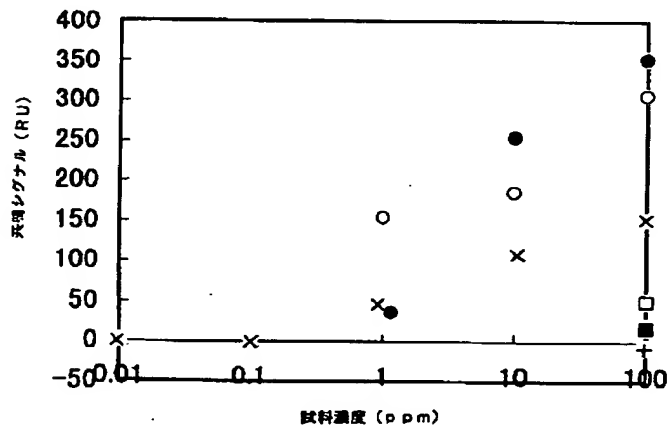


【図6】



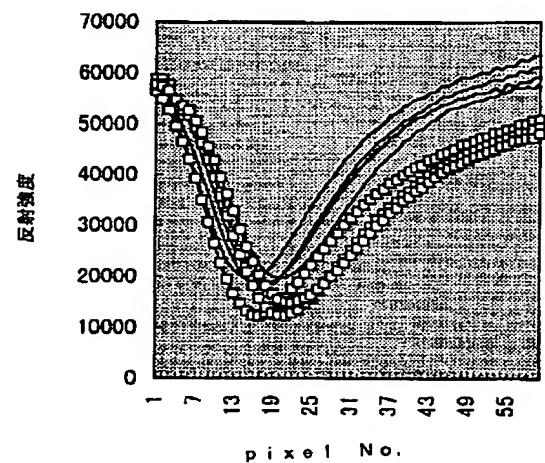
- ▲ HRP 90分 (90分露光チップ)
- △ HRP 15分 (15分露光チップ)
- BSA (90分露光チップ)
- BSA (15分露光チップ)

【図8】



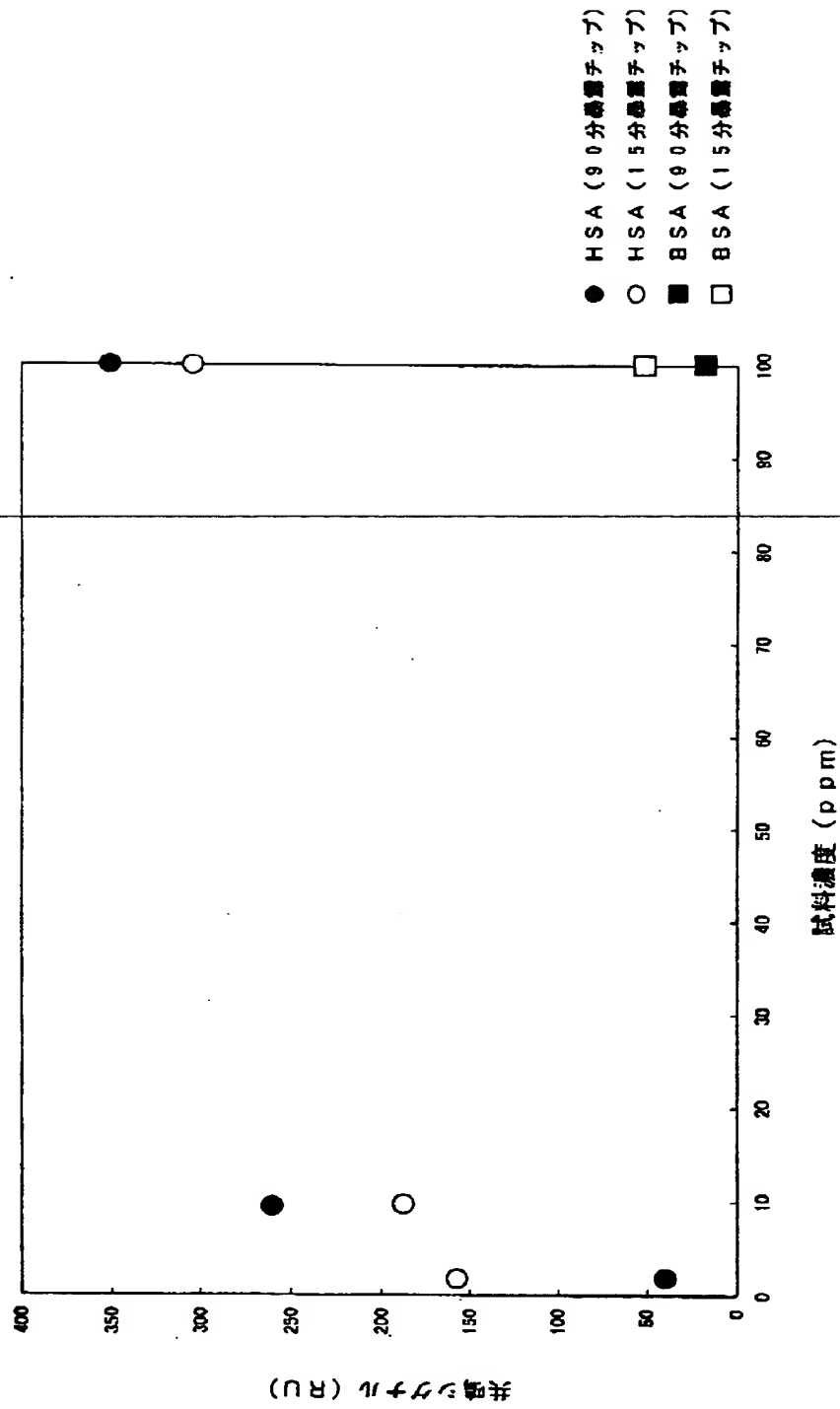
- HSA (90分露光チップ)
- HSA (15分露光チップ)
- BSA (90分露光チップ)
- BSA (15分露光チップ)
- × HSA (他) (チップ)
- + BSA (他) (チップ)

【図9】



- 金属とクロム層 (1)
- 金属とクロム層 (2)
- 金属とクロム層 (3)
- 金属とクロム層 (4)
- 金属のみ (1)
- 金属のみ (2)
- 金属のみ (3)
- 金属のみ (4)

【図5】





PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10267834 A**(43) Date of publication of application: **09.10.98**

(51) Int. Cl.

G01N 21/27
G01N 27/327
G01N 33/543

(21) Application number: **09073645**(71) Applicant: **DAINIPPON PRINTING CO LTD**(22) Date of filing: **26.03.97**

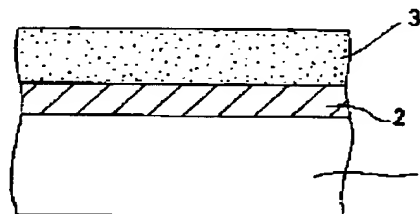
(72) Inventor: **NAGATA RYOHEI**
NAKAMURA HIROYUKI

(54) MEASUREMENT CHIP FOR SURFACE
PLASMON RESONANCE BIOSENSOR AND ITS
MANUFACTURE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To easily manufacture a measurement chip which exerts good sensitivity even to a small amount of physiological active substance to be fixed, by arranging a metallic film on a transparent substrate and then an organic silicon film on the metallic film.

SOLUTION: The measurement chip for a surface plasmon resonance biosensor has a metallic film 2 formed on a transparent substrate 1 of glass or the like and an organic silicon film 3 formed on the metallic film 2. The metallic film 2 is formed of, e.g. gold with an intervention layer of chromium by sputtering or the like manner, and the organic silicon film 3 is formed with the use of a silane-coupling agent such as γ -aminopropyl ethoxy silane by a saturated steam method or the like manner. A physiological active substance such as immuno protein or the like is fixed directly or via a water-soluble divalent reagent such as glutaraldehyde or the like to the thus-obtained measurement chip. The organic silicon film 3 is formed in a unimolecular layer of a close-packed structure, so that good sensitivity is achieved.



COPYRIGHT: (C)1998,JPO